

Lipocapsulater FD-S MA 簡単アプリケーションをご紹介します

Lipocapsulater は「水溶液を添加して終わり、1回ポッキリ・・・？」

そんなことはございません  新たな使用例をご紹介します！！

全ての人に『**より自由に、そして簡便に**』ご利用いただく為に

今回 Lipocapsulater FD-S MA を使用した

リポソームへの内包及び表面修飾使用例 をご紹介します！

注：ご紹介する使用例はあくまでも一例であり、使用する化合物の活性、修飾率、内包量を保証するものではありません。
また、化合物によってはリポソームの凝集が見られる場合もございます。

【内容】

Page 2. Lipocapsulater FD-S MA の製品概要

Page 3. 使用例の概略

Page 4. DiO 内包抗体修飾リポソームの調製方法

Page 5. 参考：抗体還元化の方法例

Page 6. DiO 内包抗体修飾リポソームの分析結果

Page 7. DiO 内包抗体修飾リポソームの物性

Lipocapsulater FD-S MA の製品概要

1. 従来製品と同様、お手持ちの化合物のリポソーム化検討が簡単にできる

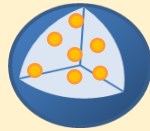
(従来品の製品概要はフナコシ HP 「Lipocapsulater のアプリケーション例」をご参照下さい)

2. リポソーム表面に**マレイミド基**が付いている為、

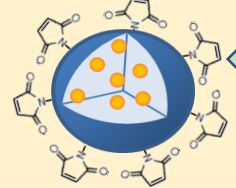
チオール基を有する任意の化合物を修飾することが可能

イメージ図

従来品 S-PE

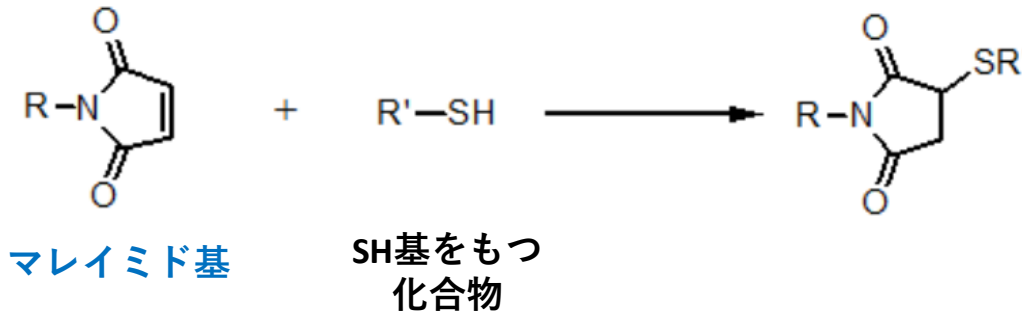


MA タイプ



マレイミド基

マレイミド基とチオール化合物の反応機構



使用例の概略

リガンドの修飾 & 脂溶性蛍光色素内包リポソームの調製をご紹介します

【調製方法は簡単 4 ステップ】



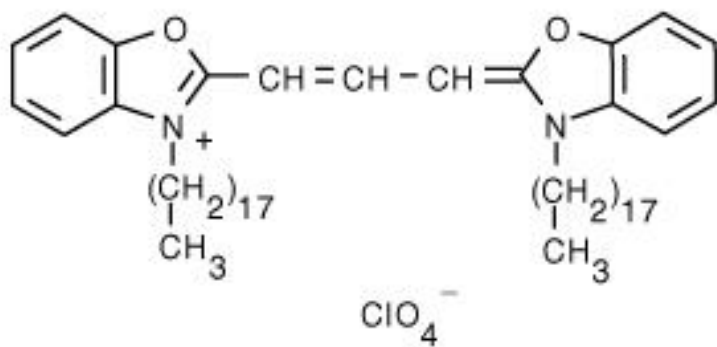
完成！
(1~2日)

蛍光色素リポソーム完成
(30 min 程度)

DMSOは除去せずに
そのまま修飾工程に

【蛍光色素 DiO 内包した抗体修飾リポソームの調製してみましょう】

脂溶性蛍光色素 DiO とは？



分子式： $\text{C}_{53}\text{H}_{85}\text{ClN}_2\text{O}_6$

分子量：881.72

励起波長：484 nm

蛍光波長：501 nm

DiO 内包抗体修飾リポソームの調製方法

ステップ1 リポソームの準備

Lipocapsulater に 10 mM HEPES buf pH7.2 (5 mM EDTA 含有)を添加し転倒混和後、10 分程度静置

ステップ2 蛍光色素 DiO の内包化

DMSO に溶解した 5 mg/mL DiO をリポソーム溶液の 1/20 量を攪拌しながらリポソームに添加し 3 分間攪拌

ステップ3 抗体修飾

リポソーム溶液 400 uL に還元化したブタ IgG^{*1} 2.8 mg/mL を 143 uL (400 ug) 添加し、攪拌しながら室温で 2 時間反応後さらに 4°C で 4 時間反応させた

ステップ4 未修飾抗体及び DMSO の除去

10 mM HEPES buf pH7.2 (5 mM EDTA 含有) で限外ろ過^{*2}を行い未修飾物及び DMSO を除去した後 0.22 um フィルター処理を行った

※1 還元化の方法は p.5 を参照

※2 限外ろ過は分画サイズ 300 kDa の遠心式限外ろ過チューブまたは透析膜を使用することができます。

《参考》抗体還元化の方法例※1

- ① 3.7 mg/mL ブタ IgG (in 10 mM PBS buf, pH7.4) に 500 mM EDTA を終濃度 5 mM、2-メルカプトエタノールを 終濃度 50 mM となるように添加し攪拌
- ② 37°C で 90 分反応後、10 mM HEPES buf pH7.2 (5 mM EDTA 含有)で限外ろ過※2を行い 2-メルカプトエタノールを除去する
- ③ 限外ろ過※2後、0.22 μm フィルター処理を行う

※1 本還元化方法は一例であり全ての抗体の還元化及びその後の活性を保証するものではありません。抗体の種類によっては凝集したり活性を失う場合もございますので、抗体の種類に合わせて検討が必要です。

※2 限外ろ過は分画サイズ 10 kDa の遠心式限外ろ過または透析膜を使用することができます。

《DiO 内包抗体修飾リポソーム分析結果》

サンプル	サンプル抗体濃度 ^{※1} (mg/mL)	脂質濃度 ^{※2} (mg/mL)	抗体回収率 [※] (%)
DiO内包抗体修飾リポソーム	0.68	5.0	53

※1 抗体濃度:BCA 法により算出

※2 脂質濃度:酵素法にてコレステロールを定量し総脂質量に換算

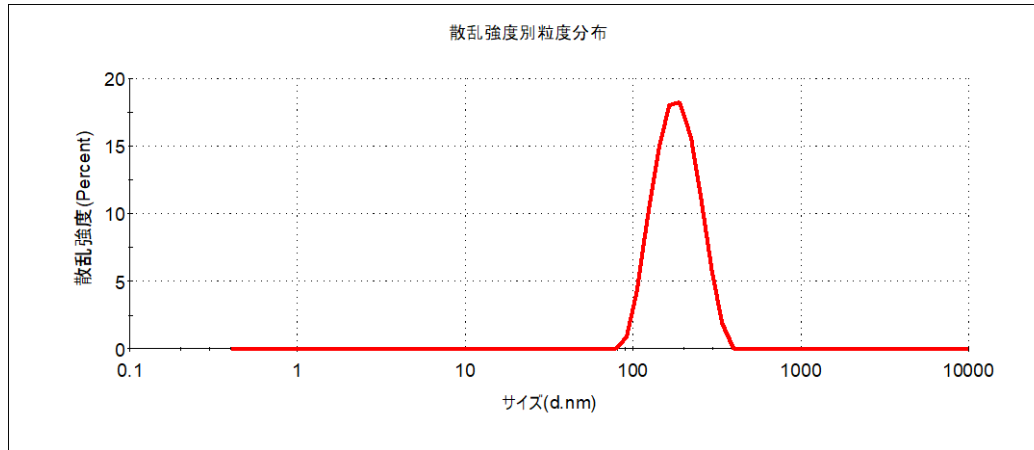
※3 抗体回収率 = サンプル抗体量/初期添加抗体量 より算出

各分析結果は社内評価におけるデータです

【定量方法のポイント 】

- 内包物を定量する場合は、クロロホルム/メタノールまたは界面活性剤でリポソームを破壊してから定量しました。
- 脂質定量は SDS 溶液を終濃度 2% になるように添加し 90°C で 15 分間煮沸処理を行いリポソームの破壊処してから定量しました。
- タンパク質定量は SDS 溶液を終濃度 2% になるように添加した後、BCA 法により測定しました。

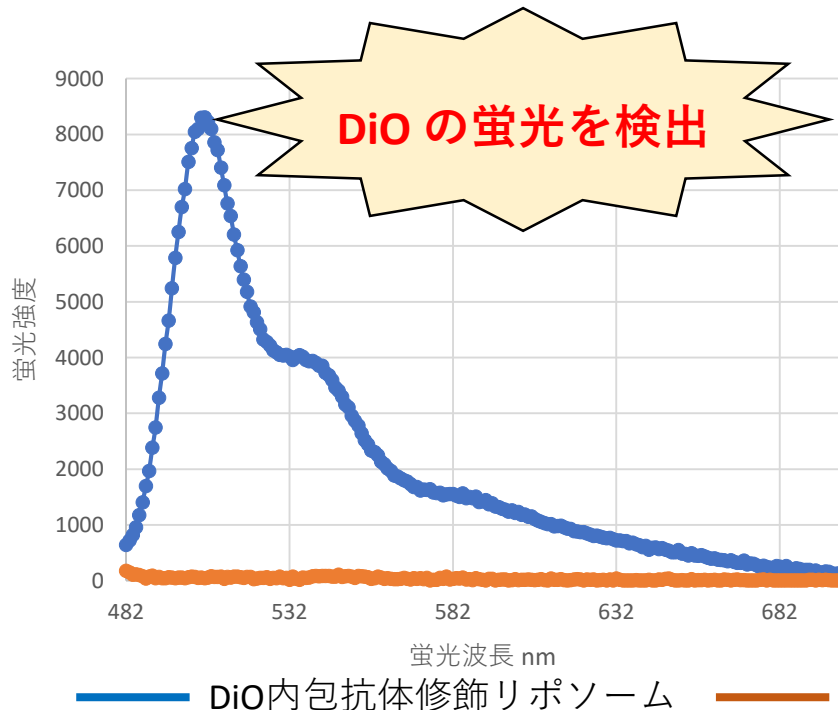
《DiO 内包抗体修飾リポソームの物性》



平均粒子径	ゼータ電位
173 nm	-27 mV

各分析結果は社内評価におけるデータです

《蛍光スペクトル確認》



① 10 mM HEPES buf, pH7.2 295 uL に DiO 内包リポソーム 5 uL 添加した
(コントロール：Lipocapsulater FD-S MA)

② 励起波長 462 nm で蛍光スペクトル (482 nm ~ 700 nm) を測定した

簡単にイメージング材料が調製可能

抗体の活性については別途、確認試験が必要です